Serologische Spezifität der Adenovirus-Toxine

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Rainer Nikolaus Döring

Saarbrücken

1973

Aus der virologischen Abteilung
(Leiter: Professor Dr.med.R.Wigand)
des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie
(Direktor: Professor Dr.med.Dr.phil.W.Zimmermann)
der Universität des Saarlandes

Serologische Spezifität der Adenovirus-Toxine

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Rainer Nikolaus Döring
aus München/Grünwald
geboren am 26.Juli 1948

Homburg/Saar 1972

Dekan: Prof.Dr.H.Kulenkampff
Referent: Prof.Dr.R.Wigand

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.7.1973

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	2
Ergebnisse	6
Diskussion	11
Zusammenfassung	18
Tabellen	19
Literatur	24

Serologische Spezifität der Adenovirus - Toxine

Einleitung

Der "early cytopathic factor" (Pereira,1958; Everett and Ginsberg,1958), auch "cell detachment" Faktor (Rowe et al.,1958) genannt, hat bis jetzt recht wenig Beachtung gefunden. Es ist ziemlich sicher, daß er in der Basis des Pentons lokalisiert ist (Valentin and Pereira,1965, Petterson and Höglund,1969). Die Antigenspezifität dieser Virusteilkomponente scheint komplex zu sein, ist aber noch nicht abschließend geklärt. Ein Weg hierzu ist die Neutralisation der toxischen Aktivität mittels Adenovirus-Immunseren der verschiedenen Typen. Bis jetzt sind in dieser Hinsicht nur wenige und gegensätzliche Ergebnisse veröffentlicht worden (Everett and Ginsberg,1958, Rowe et al.,1958, Wadell and Norrby,1969).

Für diese Studie benutzten wir cytotoxisches Material von Human-Adenoviren aller vier Untergruppen, sogar von Typen, bei welchen eine toxische Aktivität überhaupt in Frage gestellt wurde (Rowe et al.,1958; Wigand und Bauer,1964; Wadell and Norrby,1969). Bei der Kreuzneutralisation mit Kaninchenimmunseren verschiedener Typen ergab sich ein wesentlicher Unterschied zwischen den Adenoviren der Untergruppe III im Vergleich mit den Viren der Untergruppe I und II.

MATERIAL und METHODEN

Viren.

Wir untersuchten Viren der folgenden Serotypen:

Untergruppe III: Typen 1,2,4,5,6

Untergruppe I: Typen 3,7a,11,14,16,21

Untergruppe II: Typen 9,15,19,9-15

Untergruppe IV: Typ 12

Seren. Wir kreuzten die Toxine mit folgenden Kaninchen-immunseren:

Typ 1: K 326 K 327 US 1

Typ 2: K 21 K 885 Hannover

Typ 4: K 345 K 347 US 4

Typ 5: K 328 K 329 US 5

Typ 6: K 359 K 372 US 6

Typ 3: K 325 K 333 Us 3

Typ 7: K 334 K 335 US 7

Typ 11: K 352 K 365 US 11

Typ 14: K 340 K 341 US 14

Typ 16: K318 K 319 US 16

Typ 21: K 374 K 387 US 21

Typ 9: K 322 K 323

Typ 15: K 346 K 349 Rosen Mannweiler
Hexon-, Fiber-, und Dodeconantiseren

Typ 19: K 140 K 514 K 389 K 391 US 19
Hexon-, Fiber-, und Dodeconantiseren

Typ 8: K 394 K 395 US 8

Typ 10: K 342 K 343

Typ 20: K 15 US 20

Typ 22: K 388 K 393 US 22

Typ 25: K 8 K 10

Typ 28: K 397 US 28

Typ 29: K 200

Typ 12: K 173 K 174 US 12

Typ 18: K 380 K 396 Hannover

Typ 31: K 130 K 171 US 31

Typ 9-15: K 63 K 64

Typ 33-15: K 121 K 122

Bereitung der Toxine. Konzentrierte Virusstämme wurden folgendermaßen erhalten: HeLa-Zellkulturen wurden mit Virus beimpft und mehrere Tage bis zum maximalen cytopathischen Effekt (CPE) bebrütet. Danach wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 1/20 Volumen physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen aufgesprengt. Durch niedrigtourige Zentrifugation wurde der Zelldetritus abgesondert und verworfen, sodaß die Viren in konzentrierter Form vorlagen. Zur Trennung von Toxin als Bestandteil des Pentons von infektiösem Virus wurde das Viruskonzentrat 1 Stunde lang im SW 25 Rotor bei 22.500 rpm (Spinco Zentrifuge Typ L 40) auf ein Cäsiumchloridpolster von einer Dichte von 1.40 g/ml zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals 1 Stunde lang unter den gleichen Bedingungen auf ein neues Cäsiumchloridpolster zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde auf seine toxische Aktivität und auf seinen Gehalt an infektiösem Virusmaterial titriert. Der Resttiter der Infektiosität war niedriger als 1% des Ausgangsmaterials. Das schließt einen Virus-bedingten CPE in den beiden ersten Tagen nach der Inokulation aus.

Titration der Toxine. Je 0,1 ml Toxin wurde auf HeLa-Zellkulturen in einer Verdünnungsreihe von Zweierschritten geimpft. Der CPE wurde 24 Stunden nach Inokulation abgelesen. Ein definitiver CPE, der wenigstens 1/4 der Zellkultur betraf, wurde als Endpunkt betrachtet.

Trypsin-Behandlung. Toxin wurde mit dergleichen Menge von 1% igem kristallinem Trypsin (Trypure,Novo) gemischt bei einem pH von etwa 7,5. 2 Stunden nach Inkubation bei 37°C wurde die doppelte Menge von Trypsininhibitor (Worthington) zugegeben.

Neutralisation. Die Toxine wurden für die endgültige Beimpfung auf 2-4 Toxineinheiten verdünnt. Sie wurden mit der gleichen Menge Kaninchenimmunserum, das 1:5 oder höher verdünnt war, versetzt. Das Gemisch wurde 60-90 Minuten bei 37°C zur Reaktion gebracht und anschließend auf die HeLa-Zellkulturen geimpft. Stets wurde gleichzeitig eine Toxintitration durchgeführt. Als Seren wurden mindestens 2 Kaninchenimmunseren für jeden Typ aus unserem Labor (siehe oben) und ein drittes Serum des US Public Health Service (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr.W.P.Rowe und Dr.I.L.Sever, Bethseda) verwendet. Außerdem wurden auch einige Komponentenseren von Adenovirus Typ 19 und 15 (Gelderblom et al., 1968; Wigand und Meiser,1969) benutzt. Die Spezifität

der Kreuzteste wurde durch Überprüfung der Präimmunseren, das Fehlen von toxischen Effekten der Seren mit geeigneten Serumkontrollen gesichert. Keines der benutzten Immunseren zeigte einen toxischen Effekt bei der Impfdosis von 0,1 ml der 1:5 Verdünnung. Alle Neutralisationstests wurden mindestens zweimal mit übereinstimmenden Ergebnissen durchgeführt.

Ergebnisse

Vorkommen und Titer der Toxine bei den verschiedenen Serotypen

Bisher war das Vorkommen von Toxin nur bei den Adenoviren der Untergruppen III und I bekannt. Wir konnten die toxische Aktivität auch bei allen anderen untersuchten Typen, nämlich bei Typ 12 (Untergruppe IV), ebenfalls bei Typ 4 (Zwischengruppenstellung) und den Typen 9,15,19 und 9-15 der Untergruppe II nachweisen.

Die Art des CPE war für alle untersuchten Typen ähnlich mit Ausnahme des Typs 12. Hier erschienen die Zellen kleiner als bei den anderen Virustypen; dies steht in Einklang mit dem atypischen CPE, den die Viren dieser Untergruppe verursachen (Wigand und Bauer,1964).

Um die Toxinmengen der Typen vergleichen zu können, wurde der Titerbereich der gefundenen Toxinaktivität von konzentrierten Viren sowie der der gruppenspezifischen (Hexon-) Komplementbindungsaktivität derselben Virusvorräte in der Tabelle 1 gegenübergestellt. Es zeigt sich, daß die Viren der Untergruppe III die größte Menge Toxin produzieren, die Typen 4 und 12 und die Viren der Untergruppe II die niedrigste. Untergruppe I liegt dazwischen. Andererseits besteht kein großer Unterschied in der Produktion von gruppenspezifischem Antigen.

Den toxischen Effekt konnten wir bereits 4 Stunden nach der Inokulation (hpi) sehen; der Titer steigt bis 12-16 hpi an; er bleibt dann 48 hpi stehen. In einigen experimenten konnte ein Rückgang des toxischen CPE 72 hpi beobachtet werden. Dementsprechend wurden sowohl Toxintiter als auch Neutralisationstests 16 - 24 hpi abgelesen. Nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen zeigten die Toxine häufig einen 2 - 4 fachen Titeranstieg (Tabelle 2).

Charakterisierung der Toxine durch Trypsin- und Hitzebehandlung

Toxinpräparate werden durch Trypsinbehandlung leicht inaktiviert (Tabelle 3), Wie dies auch aus früheren Studien

bekannt ist (Pereira,1958; Rowe et al.,1958). Hingegen ist das infektiöse Virusmaterial relativ resistent gegen Trypsin (Wigand und Bauer,1964). Im Gegensatz dazu wird die Infektiosität der Adenoviren bei 56°C schnell zerstört (Ginsberg,1956); die toxische Aktivität ist jedoch bei dieser Temperatur stabil (Everett and Ginsberg,1958; Rowe et al.,1958). Bei unseren Versuchen (Tabelle 3) trat bei Hitzebehandlung ein 2 bis 4 facher Titerabfall regelmäßig auf; er war aber niemals stärker.

Homologe Toxinneutralisation

Es stellte sich heraus, daß die Neutralisation von Toxin mit homologen Antiseren schwach ist. Die Serumtiter waren niedrig und stark abhängig von der gewählten Toxindosis (Tabelle 4). Wir erreichten keine höheren Titer durch Verlängerung der Kontaktzeit von Toxin und Antikörper von 30 Minuten auf 6 Stunden. Höhere Antikörpertiter bei früherer Ablesung sind nur vorgetäuscht, weil nach 8 Stunden die Toxintiter noch niedriger sind als nach 24 Stunden (Tabelle 4). Allgemein wurden homologe Neutralisationstiter über 1:20 nur erreicht mit sehr niedriger Toxindosis. Niedrige Neutralisationstiter wurden auch beobachtet, wenn partiell gereinigte Toxine als Antigene verwendet wurden (Nguyen,1972).

Eine homologe Neutralisation fanden wir bei allen Serotypen und Antiseren mit wenigen Ausnahmen bei den Typen 4, 12 und 19 (Typ 12 siehe unten). Bei Typ 19 (Tabelle 8) zeigten vier von fünf homologen Seren eine Neutralisation. Bemerkenswerterweise zeigte keines von drei Typ 4-Antiseren eine Toxinneutralisation. Das Fehlen einer Reaktion heterologer Seren einschließlich Typ 16 Antiseren mit Typ 4-Toxin ist deshalb ohne Aussagekraft.

Kreuzneutralisation

Untergruppe III (Tabelle 5)

Die Typen 1, 2, 5 und 6 zeigten eine komplette Kreuzung mit allen getesteten Seren dieser Untergruppe. Zwischen homologen und heterologen Neutralisationstitern war kein Unterschied. Kein Serum von außerhalb dieser Untergruppe zeigte eine Neutralisation gegen diese Toxine; ebenfalls neutralisierten Seren der Untergruppe III kein Toxin von Typen außerhalb dieser Untergruppe. Die Toxine der Untergruppe III reagieren also rein Untergruppen-spezifisch.

Untergruppe I (Tabelle 6)

Die Typen 3 und 7 zeigten eine einseitige Kreuzneutra-

lisation von Typ 3-Toxin mit Typ 7-Serum. Toxin von Typ 7, und ebenso von den Typen 14, 16 und 21 reagierten typenspezifisch. Andererseits wurde Typ 11-Toxin von vier Antiserum-Typen derselben Untergruppe neutralisiert. Wiederum ergab sich auch hier keine Reaktion mit Seren oder Toxinen außerhalb der Untergruppe.

Untergruppe IV (Tabelle 7)

Vier von acht Antiseren dieser Untergruppe neutralisierten das Toxin von Typ 12, nämlich eines von drei Typ 12-Seren, keines von zwei Typ 18-Seren, und alle von drei Typ 31-Seren. Außerhalb der Untergruppe zeigten sieben Seren keine Neutralisation mit Typ 12-Toxin.

Untergruppe II (Tabelle 8)

Rein typenspezifische Reaktionen ergaben sich für die Typen 15 und 19. Die Typen 9 und 9-15 reagierten kreuzweise miteinander sowie mit Typ 8-Seren. Andere Seren innerhalb und außerhalb der Untergruppe II ergaben keine Neutralisation mit Toxinen dieser Untergruppe.

Neutralisation von Typ 15- und Typ 19-Toxin mit Komponentenseren

Kaninchenseren, die gegen isolierte Viruskomponenten

präpariert wurden, zeigten folgende Ergebnisse: Eine Neutralisation von Typ 15- sowie von Typ 19-Toxin wurde nur mit homologen Dodecon-Antiseren beobachtet. Keine Toxinneutralisation ergab sich dagegen mit Hexon- und mit Fiberantiseren.

Diskussion

Es ist beachtenswert, daß eine cytotoxische Aktivität bei allen untersuchten humanen Adenovirustypen nachgewiesen werden konnte. Wegen des geringen Toxingehaltes bei Adenoviren der Untergruppe II und der Typen 4 und 12 (Tabelle 1) wurden bei diesen Typen nicht schon früher Toxine gefunden.

Die zwei unterschiedlichen CPE-Arten, die Adenoviren auf HeLa-Zellkulturen hervorrufen (Wigand und Bauer, 1964), der Retraktions-CPE der Viren der Untergruppen I und III und der Rundzell-CPE der Untergruppe II und des Typs 4, erklären sich hinreichend durch die niedrige Toxinproduktion der letzteren Virustypen.

Der Zusammenhang zwischen der toxischen Aktivität mit der Pentonbasis ist bereits hinreichend dokumentiert (Valentin and Pereira,1965; Petterson and Höglund,1969). Die Tatsache, daß die Toxintiter häufig nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen ansteigen, ist möglicherweise durch ein Auseinanderbrechen von Polymeren des Pentons, wie Dimeren oder Dodecons (siehe Norrby,1969) zu erklären.

Die Toxinneutralisation mit homologen Antiseren zeigte allgemein niedrige Titer. Bei manchen Typen, bemerkenswerterweise denen mit niedrigen Toxintitern (Typen 4, 12, 19), wurden homologe Seren ohne jegliche Neutralisation gefunden. Offenbar wirken Toxine als Antigene nur schwach.

Eine eindeutige Untergruppen-spezifische Kreuzneutralisation hat sich für die Untergruppe III (Tabelle 5) gefunden. Eine Ausnahme macht Typ 4, welcher in mancher Hinsicht näher mit der Untergruppe I als mit der Untergruppe III verwandt ist (Norrby,1969). Bei der Neutralisation von infektiösem Virusmaterial sind nur ganzgeringfügige Kreuzreaktionen innerhalb dieser Untergruppe beobachtet worden (Wigand et al.,1965; Stevens et al.,1967).

Ebenfalls eine Untergruppen-spezifische Reaktion scheint bei den Toxinen der Untergruppe IV (Typen 12, 18, 31) vorzuliegen; jedoch sind hier noch genauere Untersuchungen notwendig.

Bei den anderen zwei Untergruppen konnte vorwiegend eine Typen-spezifische Toxinneutralisation nachgewiesen werden. Dies gilt für die Typen 15 und 19 der Untergruppe II; die Typen 9 und 9-15 kreuzen untereinander und mit Typ 8-Antiseren. Diese drei Typen zeigen auch eine nahezu vollständige Kreuzung in der Hämagglutinationshemmung mit Dodecon, ebenso mit Fiber-(Meiser et al.,1969) und Virionantigen (unveröffentlicht). Dagegen ergab sich keine Kreuzung in Toxinneutralisationstests mit Antiseren, die eine teilweise Kreuzung in der Hämagglutinationshemmung (10 gegen 19, 22 gegen 15, Wigand,1968) oder der Kreuzneutralisation (25,29, 33-15 gegen 15, Wigand und Fliedner,1968) zeigten.

Die Toxine der Untergruppe I zeigten ein eigenartiges Verhalten (Tabelle 6). Während die Toxine der Typen 7, 14, 16 und 21 nur mit ihren homologen Seren reagierten, kreuzte Typ 3-Toxin mit Typ 7-Antikörpern und Typ 11-Toxin mit Antiseren der Typen 3, 7 und 14. Also selbst das am weitesten kreuzende Toxin der Unter-

gruppe I, das Toxin von Typ 11, reagierte nicht mit den Immunseren der Typen 16 und 21, also nicht mit allen Immunseren dieser Untergruppe.
In anderen Tests hat sich keine Parallele zu der einseitigen Beziehung zwischen den Typen 3 und 7 ergeben. Bemerkenswert ist immerhin, daß nach Doppelimmunisierung von Kaninchen mit Typ 3 und 7 sich ein anamnestischer Anstieg der Typ 3-Antikörper nach Inokulation mit Typ 7 ergab (Soerowidjojo und Wigand,1972). Weiterhin wurde die serologische Verwandtschaft zwischen den Typen 7, 11 und 14 in der Neutralisation und - noch ausgeprägter - in der Hämagglutinationshemmung (Stevens et al.,1967; Soerowidjojo und Wigand,1972) nur teilweise in der Kreuzneutralisation des Typ 11-Toxins wiedergegeben, während Typ 7- und 14-Toxine Typen-spezifisch reagierten.
Mit der Hämagglutinations-Verstärkungstechnik (Rosen, 1960) ist eine Gruppen-spezifische Determinante in der Pentonbasis lokalisiert worden, während Untergruppen- oder Zwischengruppen-spezifische Determinanten weniger klar nachgewiesen wurden (Wadell and Norrby,1969).
Über die Toxinneutralisation wurden außer einigen vorläufigen Resultaten (Everett and Ginsberg,1958; Rowe et al.,1958) nur eine ausführliche Mitteilung

publiziert (Wadell and Norrby,1969). Diese Autoren neutralisierten gereinigte Pentons der Typen 2 und 3 mit Antiseren, die gegen Viruskomponenten verschiedener Serotypen hergestellt worden waren. Sie fanden dabei eine Gruppen-spezifische Neutralisation mit allen Antiseren, die gegen Pentons oder Polymere von Pentons von Adenoviren dreier Untergruppen gerichtet waren. Dies steht im Widerspruch zu unseren Befunden. Da jedoch die Pentonantiseren, die Wadell und Norrby benutzten, höhere homologe Titer zeigten als unsere, während die heterologen Titer mit Viren außerhalb der Untergruppe allgemein niedrig lagen, kann man diesen Befund ohne weiteres so interpretieren, daß eine schwache Gruppen-spezifische Reaktion überlagert wird von einer stärkeren Typen- oder Untergruppen-spezifischen Reaktion. Möglicherweise fehlte bei uns die Gruppenspezifische Reaktion wegen der geringeren Stärke unserer Antiseren.

Es ist unwahrscheinlich, daß man durch Verwendung von gereinigtem Penton als toxischem Antigen abweichende Resultate bei der Kreuzneutralisation erhält. Jedenfalls wurden mit partiell gereinigten Toxinen der Typen 2, 3 und 7 identische Resultate wie mit Rohvirus erhalten (Nguyen,1972).

Toxine von Adenovirus Typ 15 und 19 (Untergruppe II) wurden von homologen Dodecon-Antiseren neutralisiert, jedoch nicht von Hexon- oder Fiber-Antiseren. Dodecons können als Aggregate von je 12 Pentons (Gelderblom et al.,1967) unbedingt Antikörper gegen die Pentonbasis bilden; hingegen haben Hexons keine Antigenkomponente mit Pentons gemeinsam. Wadell und Norrby (1969) haben auch keine Neutralisation mit Hexon-Antiseren gefunden; Typ 3-, nicht aber Typ 2-Fiber-Antiserum neutralisierte das homologe Toxin.

In Anlehnung an Wadell und Norrby (1969) kann die Toxinneutralisation durch einen der folgenden Mechanismen erklärt werden:

a) durch eine direkte Wechselwirkung von Antikörpern und dem das Toxin enthaltenden Teil des Pentons
b) indirekt durch eine Verbindung der Antikörper mit einer anderen Antigendeterminante des Pentons. Hieraus könnte eine Behinderung des aktiven Toxinanteils entweder durch sterische Blockierung oder durch einen allosterischen Effekt resultieren.

Es ist noch nicht möglich, aufgrund der bisherigen Daten eine endgültige Entscheidung zu treffen zwischen diesen beiden Möglichkeiten.

Auf jeden Fall existiert eine Untergruppen-spezifische Antigendeterminante bei den Viren der Untergruppe III, entweder in der Pentonbasis (a) oder in Verbindung mit ihr (b). Es ist auffallend, daß die Viren der Untergruppe III und IV (Typ 12) längere Fiberfortsätze als die der Untergruppen I und II besitzen, bei denen keine Untergruppen-spezifische Toxinneutralisation gefunden werden konnte.

Weil die kreuzreaktiven Determinaten der Typen 8, 9 und 9-15 der Untergruppe II wahrscheinlich im Fiber lokalisiert sind (Meiser et al.,1969; Hierholzer and Dowdle,1970), scheint Mechanismus b) wahrscheinlich zu sein für die Toxinneutralisation. Wäre Mechanismus a) gültig, so müßte man die gleiche Typen-spezifische Determinante dem Fiber-Antigen und der Pentonbasis zusprechen.

Die Typenspezifität in der Toxinneutralisation bei den Typen 15 und 19 und der meisten Viren der Untergruppe I, ebenso das eigene Kreuzungsverhalten der Toxine der Typen 3 und 11, würde eine Typen- (oder Zwischentypen-) spezifische Determinante beinhalten. Diese muß, falls Mechanismus a) wirksam ist, in der Pentonbasis lokalisiert sein. Hinzu kommt die Gruppen-spezifische Determinante der Pentonbasis, wie sie sich mit der Hämagglutinationstechnik nachweisen läßt (Bauer und Wigand,1963; Norrby,1969).

Zusammenfassung

Den toxischen Faktor, der in Adenovirus-infizierten Zellkulturen den früh auftretenden CPE verursacht, fanden wir bei allen untersuchten Human-Adenovirustypen aus allen 4 Untergruppen. Die Toxinneutralisation mit Kaninchenimmunseren verschiedener Serotypen ergab folgende Beziehungen: Die Toxine der Untergruppe III (Typen 1, 2, 5, 6) verhielten sich Untergruppen-spezifisch. In der Untergruppe I reagierten die Toxine der Typen 7, 14, 16 und 21 Typen-spezifisch, während Typ 3-Toxin auch von Typ 7-Antiserum und Typ 11-Toxin von den Antiseren der Typen 3, 7 und 14 neutralisiert wurde. Toxine der Untergruppe II (Typen 9, 15, 19 und 9-15) reagierten vorwiegend Typen-spezifisch mit einer Kreuzung der Typen 9, 9-15 und 8. Es zeigte sich ferner eine Neutralisation mit homologem Dodecon-Antiserum, nicht jedoch mit Hexon- oder Fiber-Antiserum.

Diese Ergebnisse wurden gemeinsam mit den Befunden von Nguyen publiziert:

N.DÖRING, C.X.NGUYEN, and R.WIGAND: Neutralization of Adenovirus Toxins: Specifity and Antigenic Relationships. Med.Microbiol.Immunol. 157, 325 - 334 (1972)

T A B E L L E N

Tabelle 1. Titerbereich der Toxine und der Gruppen-spezifischen (Hexon-) Antigene bei konzentrierten Vorräten[§] verschiedener Adenovirus-Typen

Untergruppe oder Typ	Toxintiter pro 0,1 ml	Komplement-bindungs-Titer[&]	Verhältnis toxische / Komplement-bindungs-Aktivität
III	320 - 640	2560-5120	1/4 - 1/8
I	20 - 320	320-512o	1/8 - 1/64
4	5	2560	1/512
12	10	64o	1/64
II	5 - 40	64o-1280	1/32 - 1/128

& Nach Standard-Methoden (Wigand et al.,1966) gegen ein Menschen Rekonvaleszentenserum-Pool bestimmt

§ Etwa $2 \cdot 10^7$ infiziert HeLa Zellen pro 1 ml (siehe Material und Methoden)

Tabelle 2. Titeranstieg nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen der Toxine

Toxin-Typ	Einfrieren und Auftauen					
	1	2	3	4	5	6
6	1/16					1/32
9	1/4		1/8			
15	1/4		1/8	1/12	1/16	
15-9	1/12	1/24				
3	1/12	1/24	1/32			
7a	1/8	1/12	1/20	1/32		
14	1/16			1/32		
16	1/4		1/8			

Tabelle 3. Der Effekt von Hitze (30 min 56°C) und Trypsin auf die toxische Aktivität

Virustyp	Titer		
	unbehandelt	erhitzt	mit Trypsin behandelt
5	32	8; 16	<1
3	64	16; 32	<1

Tabelle 4. Beziehung zwischen Toxindosis, Ablesezeit und Neutralisationstiter

Virustyp	Toxin-einheiten	Ablesung ... Stunden nach Inokulation	
		8	24
6	2	80	40
	4	40	20
	8	20	10
5	2	40	20
	4	10	5
	8	<5	<5
3	2	40	40
	4	10	<5

Tabelle 5. Kreuzneutralisation mit Toxinen der Adenoviren der Untergruppe III

Virustyp	Immunserum-Typ					Immunseren außerhalb Untergruppe III
	1	2	5	6	4	
1	3/3§	3/3	3/3	3/3	0/3	0/20
2	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/20
5	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/20
6	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/20

§ Zahl der positiven Seren / Zahl der getesteten Seren

Tabelle 6. Kreuzneutralisation mit Toxinen der Adenoviren der Untergruppe I

Virustyp	Immunserum-Typ						Immunseren§ außerhalb Untergruppe I
	3	7	11	14	16	21	
3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/24
7a	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/24
11	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/24
14	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/5
16	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/5
21	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/24

§ Einschließlich drei Typ 4-Antiseren

Tabelle 7. Kreuzneutralisation mit Adenovirus-Typ 12 Toxin

Virus-typ	Immunserum-Typ							
	12	18	31	1	4	5	6	3
12	1/3	0/2	3/3	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1

Tabelle 8. Kreuzneutralisation mit Toxinen der Adenoviren der Untergruppe II

Virus-typ	Untergruppe II Immunseren						Immunseren außerhalb Untergruppe II
	15	19	9	9-15	8	andere §	
15	4/4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/12	0/7
19	0/3	5/7	0/2	0/2	0/2	0/12	0/7
9	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/12	0/7
9-15	1/4	0/2	2/2	2/2	2/2	0/12	0/7

§Einschließlich sechs Seren der Typen 20, 25, und 28

SCHRIFTTUM

BAUER,H. und WIGAND,R.: Eigenschaften der Adenovirus-Hämagglutinine. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 149, 96, 1963

EVERETT,S.F. and GINSBERG,H.S.: A toxinlike material separable from type 5 adenovirus particles. Virology 6, 770, 1958

GELDERBLOM,H., BAUER,H., FRANK,H. and WIGAND,R.: The structure of group II adenoviruses. Journal of General Virology 1, 553, 1967

GELDERBLOM,H., MEISER,W., LENGYEL,A. and WIGAND,R.: The serological relationship of the soluble antigens of adenovirus type 19. Journal of General Virology 2, 331, 1968

GINSBERG,H.S.: Characteristics of the new respiratory viruses (adenoviruses). II. Stability to temperature and pH alterations. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 93, 48, 1956

HIERHOLZER,J.C. and DOWDLE,W.R.: Immunological basis of the adenovirus 8-9 cross-reaction. Journal of Virology 6, 782, 1970

NGUYEN,C.X.: Säulenchromatographie und Antigenstruktur von Adenovirus-Toxinen. Doktor-Dissertation. Homburg (Saar), 1972

NORRBY,E.: The structural and funtional diversity of adenovirus capsid components. Journal of General Virology 5, 221, 1969

PEREIRA,H.G.: A protein factor responsible for the early cytopathic effect of adenoviruses. Virology 6, 601, 1958

PETTERSSON,U. and HÖGLUND,S.: Structural proteins of adenoviruses. III. Purification and characterization of the adenovirus type 2 penton antigen. Virology 39, 90, 1969

ROSEN,L.: A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. American Journal of Hygiene 71, 120, 1960

ROWE,W.P., HARTLEY, J.W.,ROIZMAN,B. and LEVY,H.B.: Characterization of a factor formed in the course of adenovirus infection of tissue cultures causing detachment of cells from glass. Journal of Experimental Medicine 108, 713, 1958

SOEROWIDJOJO,M. und WIGAND,R.: Doppelimmunisierung von Kaninchen mit Adenoviren der Untergruppen I und III. Med. Microbiol. Immunol. 157, 132, 1972

STEVENS,D.A., SCHAEFFER,M., FOX,J.P., BRANDT,C.D. and ROMANO,M.: Standardization and certification of reference antigens and antisera for 30 human adenovirus serotypes. American Journal of Epidemiology 86, 617, 1967

VALENTINE,R.C. and PEREIRA,H.G.: Antigens and structure of the adenovirus, Journal of Molecular Biology 13, 13 1965

WADELL,G. and NORRBY,E.: Immunological and other biological characteristics of pentons of human adenoviruses. Journal of Virology 4, 671 1969

WIGAND,R.: Serologische Beziehungen der Adenoviren der Gruppe II. Archiv für die gesamte Virusforschung 23, 40, 1968

WIGAND,R.: Adenoviruses types 20, 25 and 28: atypical members of group II. Journal of General Virology 6, 325, 1970

WIGAND,R. und BAUER,H.: Über den cytopathogenen Effekt der Adenoviren des Menschen. Archiv für die gesamte Virusforschung 14, 674, 1964

WIGAND,R., BAUER,H., LANG,F. and ADAM,W.: Neutralization of the adenoviruses types 1 to 28 specifity and antigenic relationships. Archiv für die gesamte Virusforschung 15, 188, 1965

WIGAND,R. and FLIEDNER,D.: Serologically intermediate adenovirus strains: a regular feature of group II adenoviruses. Archiv für die gesamte Virusforschung 24, 245, 1968

WIGAND,R. and MEISER,W.: Neutralization of adenoviruses by component antisera. Archiv für die gesamte Virusforschung 27, 112, 1969

WIGAND,R., WUNN,W., SCHMIDT,W.A.K. und GELDERBLOM,H.: Verfahren zur Trennung von Adenovirus-Antigenen. Archiv für die gesamte Virusforschung 19, 319, 1966

Herrn Professor Dr.med.R.Wigand danke ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes, sowie für die Anregungen, Unterstützungen und kritische Beratung bei der Bearbeitung des Themas.

Frau Ingrid Maurer danke ich für die Herstellung der Gewebekulturen.

Lebenslauf

Am 26. Juli 1948 wurde ich als erster Sohn des Architekten Winfried Döring und seiner Ehefrau Dr.med.Annemarie Döring, geborene Fleck, in Grünwald bei München geboren.

1954	Volksschule in München
1956	Volksschule in St.Ingbert
1958	Klosterschule Ettal/Obb.
1962	Theresiengymnasium München
1965	Realgymnasium St.Ingbert, humanistischer Zweig
1967	Abitur in St.Ingbert
1967/68	Studienbeginn in Humanmedizin an der Universitas Saraviensis
1970	Ärztliche Vorprüfung
1973	Ärztliche Prüfung